

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Analüütilise keemia õppetool

Indrek Saar

**Keskkonna veesisalduse mõju anioonitundlike
retseptorite seondumisvõimele**

Bakalaureusetöö

Materjaliteadus

12 EAP

Juhendajad:

Kristjan Haav, MSc

Prof. Ivo Leito

Tartu 2017

Sisukord

Lühendid.....	3
Sissejuhatus	4
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Supramolekulaarne keemia	5
1.2 Mittekovalentsed vastastikmõjud	5
1.3 Anioonitundlikud retseptorid.....	8
1.4 Solvendiefektid.....	9
1.5 Afiinsuskonstandi määramine	11
2. Eksperimentaalne osa	14
2.1 Aparatuur ja töövahendid	14
2.2 Uuritud retseptorid ja kasutatud kemikaalid.....	15
2.3 Metoodika.....	16
3. Tulemused ja arutelu	17
3.1 Tulemuste ülevaade	17
3.2 Anioonide seondumine retseptoriga U016	19
3.3 Seondumise võrdlus MeCN/H ₂ O ja DMSO/H ₂ O keskkondades	21
3.4 Anioonide seondumine retseptoriga CZ009	22
3.5 Anioonide seondumine retseptoriga CZ006	23
3.6 Järeldused	25
Kokkuvõte	27
Summary	28
Kasutatud kirjandus	29
Lisad	32

Lühendid

a	Aktiivsuskonstant
A	Neelduvus
A^-	Anioon
α	Dissotsiatsioonimäär
AcO^-	Atsetaat anioon
β	Vesiniksideme-aktseptorsust iseloomustav parameeter
BcO^-	Bensoaat anioon
γ	Aktiivsuskoeffitsient
DMSO	Dimetüülsulfoksiid
ϵ	Dielektriline läbitavus
HxO^-	Heksanoaat anioon
K_{ass}	Assotsiatsiooni- ehk seondumiskonstant
$\log K_{ass}$	Seondumiskonstandi kümnendlogaritm
MeCN	Atsetonitriil
pK_a	Happe dissotsiatsioonikonstandi negatiivne logaritm
RH	Retseptor
RHA^-	Retseptor-anioon kompleks
TMR	Tuumamagnetresonants

Sissejuhatus

Supramolekulaarse keemia üks praegusel ajal kiiremini arenevaid tegevusvaldkondi on anioone siduvate sünteetiliste retseptorite uurimine ja arendamine. Kuna supramolekulaarse keemia üheks peamiseks inspiratsiooniks on loodus ja seal leiduvad molekulaarsel äratundmisel põhinevad protsessid, siis on ka oluline arendada välja retseptoreid, mis oleksid suutelised toimima puhtas vees või kõrge veesisaldusega keskkondades. Üks tavalisemaid vastastikmõjusid sünteetiliste retseptorite ja anioonide vahel põhineb vesiniksidemetel. Samas on vesi ise väga tugev vesiniksideme doonor ja aktseptor. Vesikeskkondades kipub seetõttu retseptorite ja anioonide vaheline vastastikmõju nõrgem olema kui apolaarsetes keskkondades. Selleks, aga et arendada välja sünteetilisi retseptoreid, mis on võimelised selektiivselt kõrge veesisaldusega keskkondades anioone tuvastama on eelnevalt oluline saada aimu efektidest, mis leiavad aset taolistes keskkondades anioonide seondumisel.

Anioonide uurimise vesikeskkonnas teeb eelkõige oluliseks tõsiasja, et paljud bioloogilised ühendid eksisteerivad just anioonide näol. Üheks levinuimaks anioonide liigiks looduses on erinevate karboksüülhapete anioonid, mida leidub näiteks elusorganismide "ehituskividenäol" aminohapete ja rasvhapete näol, kuid ka arvukate metaboliitide ja bioaktiivsete ainete näol. Seega on laialdase leviku ja oluliste funktsioonide tõttu karboksülaatide seondumise uurimine ja sisalduse määramine väga vajalik.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kuidas karboksülaataniooni seondumine retseptori külge sõltub veesisaldusest keskkonnas. Töö käigus plaanitakse uurida 3 struktuurilt erineva aniooni: atsetaadi, bensoaadi ja heksanoaadi seondumist 3 sünteetilise retseptoriga erineva veesisaldusega dimetüülsulfoksiidi ja atsetonitriili keskkondades. Määratakse retseptor-anioon komplekside seondumiskonstantide ($\log K_{\text{ass}}$) väärtused vastavates keskkondades, kasutades selleks UV-vis spektrofotomeetrilist tiitrimist.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Supramolekulaarne keemia

Supramolekulaarne keemia on keemia haru, mis on tuntuks saanud kui „molekulide ülene keemia“, tegeledes kahest või enamast osakesest (molekulist või ioonist) koosnevate süsteemide ja nende vahel mõjuvate mittekovalentsete vastastikmõjude uurimisega. Peamiseks eesmärgiks supramolekulaarses keemias ongi neil jõududel põhinevate molekulaarsete struktuuride loomine, nende uurimine looduslikes süsteemides ja neil põhinevate seadmete välja arendamine.

Peamisteks arengusuundadeks, millega supramolekulaarses keemias tegeletakse on isemoodustuvad ja iseorganiseeruvad molekulaarsed struktuurid, molekulaarsed sensorid ja supramolekulaarne katalüüs ning transport [1,2]. Näideteks nendest valdkondadest on isemoodustuvad supramolekulaarsed polümeerid [3], imiinium ioonide supramolekulaarne katalüüs [4] ning vees lahustuvate nanotorude välja arendamine ravimitranspordiks [5]. Seega on tegu väga laia teadusharuga, mis lisaks analüütilisele keemiale ja molekulaarsele bioloogiale, hõlmab tugevalt ka materjaliteadust ja ravimitööstust.

Vaadates lähemalt molekulaarsete sensorite valdkonda, siis põhiliselt uuritakse retseptor-substraat või võõrustaja-külaline komplekside süsteeme. Selles kontekstis ongi sensori olulisimaks komponendiks retseptor, mis interakteerub analüüdiga ning seda protsessi on võimalik mingi mõõdetava signaali muutusega detekteerida [6]. Samas on oluline eristada lihtsalt seondumist kõrge selektiivsusega (ideaalis spetsiifilisest) seondumisest, mille käigus retseptor on võimeline seonduvat analüüti teiste proovis olevate ainete kõrval „ära tundma“ [2]. Selliseks näiteks on püridoksaali põhjal sünteesitud retseptor, mis suudab selektiivselt atsetaat- ja fluoriidiooni siduda, muutes ka seeläbi silmale nähtavalt lahuse värvi [7].

1.2 Mittekovalentsed vastastikmõjud

Mittekovalentsete vastastikmõjude näol on tegu üsna laialdase keemiliste jõudude grupiga, mis tugevuselt varieeruvad suhteliselt tugevatest, mõnesaja kJ mol^{-1} ulatuvatest koordinatiivse sideme jõududest nõrkade, mõne kJ mol^{-1} suuruste van der Waalsi jõududeni. Mittekovalentsed vastastikmõjud jäävad tugevuse poolest kovalentsetele alla. Viimaste

energia on keskel läbi 150-450 kJ mol⁻¹. Siiski on võimalik erinevat liiki mittekovalentseid vastastikmõjusid kombineerides luua stabiilseid supramolekulaarseid struktuure. Veel üheks oluliseks erinevuseks mittekovalentsete ja kovalentsete vastastikmõjude vahel on see, et mittekovalentsed vastastikmõjud on pigem dünaamilise iseloomuga ja võimaldavad vajadusel moodustunud sidet kergesti katkestada. [8,9]

Mittekovalentsete jõudude hulgast suurima ja ka tugevaima grupi moodustavad elektrostaatilisest vastastikmõjud. Neist omakorda tugevamaid on ioon-ioon vastastikmõjud, mille tugevus on keskel läbi 100-350 kJ mol⁻¹. Siinkohal mõjutab interaktsiooni tugevust laengute vaheline kaugus ning nende delokalisatsiooni ulatus. Seega, hoolimata sellest, et ioon-ioon tüüpi vastastikmõju pole kindla suunaga, on geomeetria siin siiski üsna suur roll. Ioon-dipool vastastikmõjude puhul, mis on veidi nõrgemad (50-200 kJ mol⁻¹) on molekulide paigutus tekkiva sideme seisukohast olulisem. Üheks näiteks taolisest süsteemist on leelismetallide kompleksid krooneetritega. Mõnevõrra nõrgemad jõud on kahe dipooli vahel mõjuvad jõud (5-50 kJ mol⁻¹), kus molekulide orientatsioon mängib samuti olulist rolli. Veel üheks suhteliselt nõrgaks vastastikmõjuks on nn π - π -interaktsioonid, mis esinevad nii π -süsteemide vahel kui ka π -süsteemide ja ioonide vahel. [8]

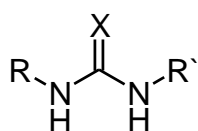
1.2.1 Vesinikside

Üheks põhiliseks vastastikmõjuks, millega molekulaarsete retseptorite väljaarendamisel tegeletakse on vesiniksidemed. Tegu on ka ühe olulise jõuga biokeemias, mis panustab DNA ahela moodustumisse, samuti valkude heeliksiks kokku-voltimisse (sekundaarse struktuuri tekkesse). Vesiniksidemed liigitatakse tugevateks (60-120 kJ mol⁻¹), kui heteroatomite vaheline kaugus on 2.2-2.5 Å, keskmise tugevusega (15-60 kJ mol⁻¹), kui aatomite vahekaugus on 2.5-3.2 Å ja nõrkadeks (alla 15 kJ mol⁻¹), kui heteroatomite vahekaugus on kuni 4 Å. Sellise jaotus üheks põhjuseks on asjaolu, et tugevad vesiniksidemed on oma olemuselt lähedased kovalentsele sidemele ning keskmise tugevusega ja nõrgad vesiniksidemed on peamiselt elektrostaatilisest. Samuti mängib vesiniksideme tugevuse juures rolli moodustavate aatomite vaheline nurk, olles tugeva sideme korral 175-180 kraadi, tagades sellega ka hea kontrolli moodustava kompleksi tekkel. Keskmise tugevuse puhul on see nurk 130-180 kraadi ja nõrgal 90-150 kraadi, mis tähendab suuremat sidemete paindlikkust. Lisaks on oluline arvestada, et vesinikside laetud osakesega on märksa tugevam kui vesinikside neutraalsete molekulide vahel. Näiteks vesiniksideme tugevus F-H...F⁻ puhul on ligikaudu 160 kJ mol⁻¹, mis on ka tugevaim teadaolev vesinikside. [8]

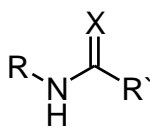
Põhjusteks, miks vesiniksidemed on ühed peamised vastastikmõjud, mille peale sünteetiliste retseptorite arendamisel keskendutakse on nende tugevus ja suhteliselt hea geomeetriline kontrollitavus, mis annab võimaluse muuta retseptorit suhteliselt selektiivseks mõne keerulisema geomeetriaga molekuli või iooni suhtes. Ainult elektrostaatiliste jõudude kaudu taolist selektiivsust saavutada on palju keerulisem. Lisaks võib olla mitmeid vesiniksidemeid andvate rühmadega retseptorite arendamine, mis ka orgaanilistes solventides lahustuvad, tunduvalt hõlpsam kui keskendudes ainult elektrostaatilistele efektidele. [10]

Molekulaarsetes retseptorites kasutatakse enamasti erinevaid NH sidet sisaldavaid funktsionaalrühmi, kuna alternatiivne OH side kipub enamasti kergemini deprotoneeruma. Tüüpilisemad fragmendid, mida kasutatakse neutraalsete vesiniksideme doonorsete retseptorite arendamises on uuread, amiidid, karbasoolid, indoolid. [11]

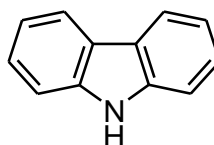
Joonis 1. NH sidet sisaldavad ühendid



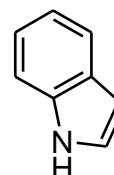
Uurea (X = O)
Tiouurea (X = S)



Amiid (X = O)
Tioamiid (X = S)



Karbasool



Indool

1.2.2 Solvofoobne efekt

Lisaks neile interaktsioonidele, esineb ka keskkonna mõjust tulenev solvofoobne efekt. Kui keskkonnaks on vesi, siis nimetatakse seda hüdrofoobseks efektiks. See ilmneb kui polaarsete solvendimolekulide omavahelised jõud on tugevamad kui nende vastastikmõju soluudi molekulidega ja väljendub selles, et sellises solvendis kõrge polaarsusega solvendimolekulid tõrjuvad madala polaarsusega soluudimolekulid endi keskelt välja ning viimased seega "kokku kleepuvad", st näivald tugevas omavahelises vastastikmõjus on. Eriti oluliseks muutub see efekt vee kui solvendi korral. Vee molekulid on väikesed ja saavad anda omavahel vesiniksidemeid. Seetõttu on ka mittepolaarsete orgaaniliste ainete lahustumisel energeetiliselt pigem eelistatud vee struktuuri terviklikkus, sest vesiniksidemete katkemisele kuluv energia on palju suurem, kui uute solvent-soluut molekulide vastastikmõjul tekkiv energia. Sellepärast toimubki eelistatult mittepolaarsete molekulide omavaheline interakteerumine, et vähendada nende summaarsed kokkupuutepinda veemolekulidega. [12]

Lisaks on hüdrofoobne efekt eriti märkimisväärne suuri hüdrofoobseid õõnsusi sisaldavate makromolekulide puhul, kui seal toimub varem õõnsuses olnud veemolekulide asendumine mõne mittepolaarse molekuliga. Seeläbi toimub õõnsuses olnud veemolekulide vabanemine ja uute vesiniksidemete teke ümbritsevate veemolekulidega, mis omakorda annavad olulise panuse seondumise entalpia- ja entroopiafaktorisse. Üheks näiteks sellisest süsteemist on tsüklodekstriinide hea madala polaarsusega orgaaniliste molekulide sidumisvõime vees [13]. Samas esineb hüdrofoobne efekt mõnevõrra väiksemal määral ka kõigis teistes hüdrofoobseid osasid sisaldavate molekulide puhul. [8]

1.3 Anioonitundlikud retseptorid

Anioone siduvate retseptorite uurimine ja välja arendamine on oluline anioonide väga laialdase loodusliku leviku tõttu. Nimelt esinevad väga paljud levinud ühendid bioloogilistes ja tehnoloogilistes süsteemides just anioonide kujul. Anioonid on geneetilise info kandjateks (DNA on polüanioon) ning samuti on enamik ensüümidega seotud protsesse suuresti anioone hõlmavad [14]. Lisaks on keskkonna saaste uurimisel anioonidel oluline roll, sest anioonid on seotud veekogude eutrofeerumisega ning erinevate saastumisprotsessidega. [14,15]

Samas on anioonsete analüütide jaoks retseptorite välja töötamine märksa keerulisem kui katioonsete jaoks. Nimelt on anioonide laeng nende mõnevõrra suurema raadiuse tõttu rohkem hajutatud, mis tingib nõrgemad elektrostaatiliselt vastastikmõjud. Lisaks on paljud anioonid tundlikud keskkonna pH-le, protoneerudes madalatel pH väärtustel kaotades nii oma negatiivse laengu. Samuti on terve rida huvipakkuvaid anioone võrdlemisi suured ja keeruka geomeetriaga, mis eeldab ka keerulisema struktuuriga retseptorite välja arendamist. [14,15]

Keskendudes anioonitundlike retseptorite ehitusele, on oluline võtta arvesse nii aniooni, mida soovetakse siduda kui ka ümbritsevat keskkonda. Tuleb arvestada elektrostaatiliste jõudude olulisust anioonide laengu tõttu ning seda, et hüdroksüülrühma sisaldavad solvendid annavad anioonidega tugevaid vesiniksidemeid. Seega peaks hea retseptor anioonide sidumiseks olema võimeline edukalt konkureerima ümbritsevate solvendimolekulidega. [14]

Veel üheks oluliseks osaks anioonitundlike retseptorite puhul on tekkinud kompleksi tuvastamine. Enamasti uuritakse retseptoreid, millelt saadakse optilist informatsiooni, kuid tegu võib olla näiteks ka elektrokeemilise signaaliga. Optiliste anioonsensorite puhul toimub tuvastamine enamasti neeldumis- või fluorestsents-signaali muutusena. Selliste süsteemide peamiseks eeliseks on nende kõrge tundlikkus, mis võimaldab anioonide madalaid

kontsentratsioone detekteerida. Samuti on võimalik anioone määrata bioloogilistes süsteemides. Taoline optiline tuvastus saavutatakse enamasti mõne kromofoori või fluorofoori sidumisel retseptorisse. Üks lihtsamaid näiteid sellisest kromofoorist on ulatuslikku konjugeeritud π -süsteemi sisaldav retseptor [11]. Samas on oluline, et see detekteeritav neeldumine ilmneb vaid interaktsioonil soovitava aniooniga. [11]

Käesolevas töös uuritakse retseptoriga seondumise seisukohast kolme karboksüülhappe aniooni – atsetaati, bensoaati ja heksanoaati. Need anioonid erinevad teineteisest mitmete omaduste poolest ning igaüks on teatava struktuurse iseärasuse kandja. Atsetaat on keskmise aluselisusega (etaanhappe pK_a väärtus DMSO's 12.3) [16] ja kõige väiksemate mõõtmetega. Heksanoaat on neist kõige aluselisem (heksaanhappe pK_a väärtus DMSO's 12.5) [17] ning samamoodi alifaatne anioon, kuid on atsetaadist oluliselt suurem ja hüdrofoobsem. Bensoaat on kõige vähem aluseline (bensoehappe pK_a DMOS's 11.1) [16], hüdrofoobne, kuid erinevalt heksanoaadist sisaldab aromaatsset struktuuri.

1.4 Solvendiefektid

1.4.1 Üldised põhimõtted

Võttes arvesse, et enamasti kogu anioon-retseptor süsteemide seondumise uurimine toimub solvendikeskkonnas, siis ei ole võimalik rääkida seondumisest ilma ümbritsevat keskkonda arvestamata. Nimelt sõltub seondumise tugevus suuresti ümbritseva solvendi dielektriliselt läbitavusest, anioone solvateerivast võimest ja vesiniksideme aktseptoorsest võimest. Seondumine on seda tugevam, mida madalam on keskkonna dielektriline läbitavus, mida nõrgemini solvateerib keskkond anioone ja mida nõrgem vesiniksideme aktseptor on keskkond. Uurides anioonide seondumist vesikeskkonnas, muutuvad need asjaolud oluliseks takistuseks, sest vee dielektriline läbitavus on kõigist üldtuntud solventidest üks suurimaid ($\epsilon=78,36$) [18], vesi on üks tugevamini anioone solvateerivaid lahusteid ja vesi on tugevalt vesiniksideme-aktseptoorne keskkond. [19]

Vaadates konkreetselt solvendi mõju põhiliselt vesiniksidemete tõttu tekkivatele kompleksidele, siis seondumistugevus väheneb enamasti solvendi polaarsuse tõusuga. Sellist käitumist illustreerib näiteks rida [20]: $\text{CCl}_4 > \text{CHCl}_3 > \text{CH}_3\text{CN} > \text{DMSO} > \text{CH}_3\text{OH} > \text{H}_2\text{O}$.

Selle üheks põhjuseks on anioonide tugev solvatatsioon polaarsetes solventides, mis omakorda vähendab anioon-retseptor kompleksi tekkimisel entalpia soodustavat mõju (kuid

võib mõnikord viia selleni, et tekib entroopiaefekti soodustav mõju) [20]. Samas ei tähenda see, et kõrge polaarsusega keskkondades poleks vesiniksidemete abil seonduvate retseptor-anioon komplekside uurimine oluline. Näiteks on vesiniksidemetega komplekside teke üks põhilisi molekulidevahelise vastastikmõju liike paljudes bioloogilistes süsteemides, kus vesi on paratamatult peamine ümbritsev solvent. See leiab aset näiteks valkude ja nukleiinhapete puhul, kus seondumised toimuvad vesiniksidemete ja hüdfoobse efekti koosmõjul. [10]

1.4.2 Solvendi valik

Solvente saab jagada nende spetsiifiliste interaktsioonide põhjal anioonide ja katioonidega dipolaarseteks aprotoonseteks ja protoonseteks ning apolaarseteks aprotoonseteks solventideks. Erinevus seisneb solvendimolekulide dipolaarsuses ja nende võimes käituda vesiniksideme doonorina.

Protoonsed solvendid on võimelised andma sidet oma vesinikuaatomi ning mõne elektronegatiivsema elemendi vahel, olles seega vesiniksideme doonorid. Nende solventide dielektrilised läbitavused on enamasti üsna kõrged ning tegu on heade anioonide solvateerijatega tänu nende võimele anda vesiniksidemeid. See võime muutub veelgi olulisemaks solvateeritud iooni laengutiheduse kasvuga. Mida tugevam solvatatsioon leiab aset, seda enam on aniooni reaktsioonivõime vähendatud. Sellised lahustid on näiteks vesi, ammoniaak, alkoholid, karboksüülhapped ja primaarsed amiidid. [12]

Dipolaarsetel aprotoonsetel solventidel on samuti enamasti suhteliselt kõrge dielektriline läbitavus ja märkimisväärne dipoolmoment. Samas pole aga tegu vesiniksideme doonoritega, kuna nende C-H sidemed pole piisvalt polariseeritud. Küll aga võivad need olla elektronpaari doonorid ja seega head katioonide solvateerijad ning vesiniksideme aktseptorid. Tähtsaimateks sellisteks solventideks on atsetoon, atsetonitriil, bensonitriil, N,N-dimetüülformamiid, dimetüülsulfoksiid, nitrobenseen ja tsüklilised karbonaadid. [12]

Dipolaarsetes aprotoonsetes solventides leiab anioonide solvatatsioon aset peamiselt ioon-dipool-, ioon-indutseeritud dipool- ja dispersioonijõudude tõttu. Viimased on olulised eriti just suurte, polariseeritavate, anioonide puhul, millel on madal laengutihedus. Seega, kuigi need lahustid kipuvad olema võrreldes protoonsete lahustitega halvad anioonide solvateerijad, on nad tavaliselt seda paremad mida suurem ja „pehmem“ on anioon. Seetõttu on ka anioonide reaktsioonivõime dipolaarsetes aprotoonsetes solventides võrreldes protoonsetega

kõrge ning näiteks S_N2 tüüpi reaktsiooni kiirus võib suureneda mitmeid suurusjärke kui protoonse solvent vahetatakse dipolaarse aprotoonse vastu. [12]

Apolaarsed aprotoonsed solvendid on enamasti madala dielektrilise läbitavuse ja väikese dipoolmomendiga ning nad ei ole võimelised olema vesiniksideme doonorid. Nad interakteeruvad soluudi osakestega kahest eelmisest lahustite grupist nõrgemini, kuna ainult mittespetsiifilised suunatud, induktiivsed ja dispersioonijõud võivad aset leida. Seetõttu on seondumisprotsesside uurimise seisukohast tegu heade solventidega, kui seondumine põhineb vaid nõrkade vesiniksidemete tekkel. Sellesse gruppi kuuluvad alifaatsed ja aromaatsed süsivesinikud, nende halogeensed derivaadid, eetrid, tertsiaarsed amiinid jt. [12]

Käesoleva töö kontekstis kasutatakse anioonitundlike retseptorite uurimiseks atsetonitriili ja dimetüülsulfoksiidi. DMSO on neist polaarsem ($\epsilon = 46,45$) [18] ning võtab aktiivselt osa vesiniksidemete moodustamisest, olles väga hea vesiniksideme aktseptor ($\beta = 0,76$) [21]. Vesiniksideme-donoorsed omadused dimetüülsulfoksiidil praktiliselt puuduvad. Nende omaduste tõttu on tegu ka väga hea lahustiga nii polaarsetele kui ka mittepolaarsetele ainetele. Ainult nõrkadel vesiniksidemetel põhinevate komplekside uurimiseks aga DMSO oma heade vesiniksideme aktseptoorsete omaduste tõttu ei sobi, kuna suudab edukalt anioonidega vesiniksideme doonori pärast konkureerida [22].

MeCN on veidi vähem polaarne ($\epsilon = 35,94$) [18] ning vesiniksideme moodustumise koha pealt on tegu üsna nõrga aktseptoriga ($\beta = 0,40$) [21]. Seetõttu sobib see veidi paremini erinevate vesiniksidemel baseeruvate komplekside uurimiseks.

1.5 Afiinsuskonstandi määramine

1.5.1 Üldised põhimõtted

Anioon-retseptor kompleksi teke on enamasti tasakaaluline protsess ning selle termodünaamilist stabiilsust kirjeldab tasakaalukonstant K_{ass} . Eeldades, et aniooni A^- ja retseptori RH seondumisstõhhiomeetria on 1:1, on vastava kompleksi RHA^- teke kirjeldatav võrrandiga (1):



Lisaks on K_{ass} või praktikas enamasti selle kümnendlogaritm $\log K_{\text{ass}}$ kvantitatiivne suurus, mida kasutatakse aniooni ja retseptori vahelise seondumise kirjeldamiseks ja seda nimetatakse ka seondumis- või assotsiatsioonikonstandiks. See avaldub võrrandis (1) esinevate osakeste aktiivsuste kaudu järgmiselt:

$$K_{\text{ass}} = \frac{a_{\text{RHA}^-}}{a_{\text{RH}}a_{\text{A}^-}} \quad (2)$$

Vastavalt võrrandile (2) on seondumiskonstandi leidmiseks vaja teada aniooni aktiivsust ja seondunud ning vaba retseptori aktiivsuste suhet. Neist viimase määramine toimub eksperimendist saadud andmete põhjal ja on seega suhteliselt lihtne, samas kui aniooni aktiivsuse usaldusväärne määramine on märksa komplitseeritum. Nimelt võivad lahuses esineda mitmesugused kõrvalised efektid nagu ioonpaardumine [23] või homokonjugatsioon [24], mis vähendavad aniooni aktiivsust lahuses. Ioonpaardumise näol on tegu efektiga, kus anioon seondub mõne lahuses leiduva positiivse laenguga osakesega, moodustades nii ioonpaari. Homokonjugatsiooni puhul moodustab anioon kompleksi endale vastava konjugeeritud happega (HA). Need efektid esinevad peamiselt just keskmise ja madala polaarsusega lahustites. Kui lahustina on kasutusel mõne orgaanilise lahusti ja vee segu, siis mida kõrgem on veesisaldus, seda kõrgem on ka lahusti polaarsus ja seda vähem on need efektid probleemiks. Käesolevas töös kasutatud MeCN-vesi ja DMSO-vesi segud on piisavalt kõrge polaarsusega, et nimetatud efektid võib vaatluse alt välja jätta.

Vastasel korral oleks üheks võimalikuks lahenduseks nendele probleemidele ka absoluutsete mõõtmiste asemel läbi viia suhtelisi seondumiskonstantide määramisi, mida meie töörühmast ka Kristjan Haav on edukalt demonstreerinud [25]. Suhteliste afiinsuskonstantide määramise puhul mõjuvad kõik kõrvalised efektid korraga kahele mõõdetavale retseptorile võrdselt ja seega saab määrata täpselt nende retseptorite seondumise tugevuse erinevuse. Tegu on sisuliselt sama meetodiga, nagu seda tehakse ka pK_a väärtuste leidmiseks erinevate hapete või aluste jaoks mittevesikeskkonnas. [24,26]

1.5.2 Seondumiskonstantide määramise meetodid

Seondamiskonstantide määramiseks on mitmeid erinevaid meetodeid, millest levinumateks on UV-Vis spektroskoopia, TMR spektroskoopia, fluorestsentspektroskoopia ja isotermilise tiitrimise kalorimeetria [8]. Kõigi nende meetodite korral määratakse tänu tiitrimisele seondunud ja seondumata retseptori tasakaalulise kontsentratsiooni suhet. Konkreetse meetodi

valik sõltub uuritavate ühendite omadustest (näiteks kromofoori või fluorofoori olemasolust) ja ka sellest, mis informatsiooni ning kui täpselt tahetakse saada.

Käesolevas töös mõõdetakse absoluutseid seondumiskonstante, kasutades UV-Vis spektrofotomeetrilist meetodit. Tegu on võrdlemisi lihtsa, täpse ja tundliku meetodiga. Seondumiskonstantide määramine põhineb vaba ja komplekseerunud retseptori neeldumise intensiivsuse erinevusel. Valmistatakse lahused, mis sisaldavad teadaoleva aniooni kontsentratsiooni korral nii vaba kui seondunud retseptorit ja nende sisalduste suhet mõõdetakse. Sellised lahused valmistatakse puhtale retseptorilahusele järk-järgult aniooni sisaldava lahuse lisamisega, kuni kogu retseptor on komplekseerunud. Seejuures on oluline, et retseptor sisaldaks kromofoorseid osasid, mis neelaks UV või nähtava valguse piirkonnas ning aniooni lisamisega selle neelduvuse intensiivsus muutuks märgatavalt. Komplekseerunud ja vaba retseptori aktiivsuste suhe on igas tiitrimise punktis on leitav vastavalt võrrandile (eeldades 1:1 stökhhomeetriat ja aniooni poolset mitteneelamist uuritavas piirkonnas): [8]

$$\frac{a_{RHA^-}}{a_{RH}} = \frac{A_{eks} - A_{RH}}{A_{RHA^-} - A_{eks}} \quad (3)$$

, kus A_{eks} on eksperimendis mõõdetud neelduvus ning A_{RH} ja A_{RHA^-} on vastavalt vaba ja komplekseerunud retseptori neelduvused.

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Aparatuur ja töövahendid

UV-Vis spektrite registreerimiseks kasutati kahekiirelist Thermo Nicolet Evolution 300 spektrofotomeetrit, mida juhiti Vision 4.2 tarkvaraga. Mõõtmised viidi läbi *Intelliscan* kiiruse režiimis, mille korral valib spektromeeter ise sobiva skaneerimiskiiruse sõltuvalt neeldumisest vastaval lainepikkusel. Mõõtmine võib toimuda alates 1 nm/min intensiivsete maksimumide korral, kuni 1200 nm/min neeldumisvabade alade korral. Pilulaiuseks oli seatud 1,5 nm ning info salvestamise kiirus oli tavaline (*normal*). Kõigi DMSO keskkonnas olevate mõõtmiste jaoks oli skaneerimisvahemik 260-500 nm ning MeCN keskkonnas oli selleks 200-500 nm. Spektromeeter oli varustatud Peltier' termostaadiga, mis hoidis kõigi mõõtmiste vältel küvetikambrites temperatuuri ($25,0 \pm 0,1$) °C.

Proovi- ja võrdlusküvettidena kasutati kvartsist 1 cm optilise teepikkusega küvette. Lisaks oli prooviküvetis teflonkattega magnetsegajapulki ning küvett oli suletav keeratava plastmassist korgiga, milles olevat ava kattis tefloniga kaetud silikoonist septum.

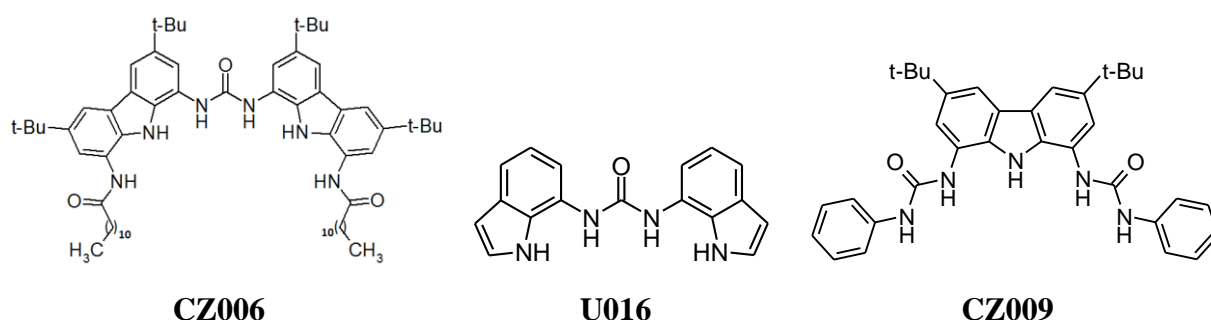
Kõikide lahuste ja nende lahjenduste valmistamine toimus gravimeetriliselt ning selleks kasutati Sartorius CPA225D-0CE kaalu lahutusvõimega 0,00001 g. Retseptorite ja anioonide tetrabutüülammooniumsoolade lahused valmistati 4 ml boorsilikaatklaasist viaalidesse ning solvendilahused 15 ml boorsilikaatklaasist viaalidesse või 50 ml klaasist purkidesse. Tahkete ainete ülekandmiseks kasutati spaatlit ning lahuste valmistamiseks kasutati 100 µl, 1 ml, 5 ml ja 10 ml Eppendorfi automaatpipette. Tiitrimisel kasutati 100 µl automaatpipetti või automaatdosaatoriga varustatud Hamilton Gastight 100 µl süstalt, mis võimaldas titranti lisada minimaalselt 2 µl kaupa. Süstla kasutamine oli eriti oluline just MeCN/H₂O segude korral, sest see võimaldas vähendada mõõtmiste käigus lenduva solvendi hulka.

Tiheduse mõõtmiste juures kasutati U10 termostaati, milles seati temperatuur 25°C peale ning mõõtmine toimus 10 ml püknomeetris. Kaalumised tehti samuti eelpool mainitud Sartoriuse kaaluga. Mõõtmiseks asetati püknomeeter ligikaudu 30 minutiks eelnevalt soojendatud termostaati ning seejärel korrigeeriti vedeliku nivoo vastavaks püknomeetril toodud märgisele.

2.2 Uuritud retseptorid ja kasutatud kemikaalid

Retseptoritena kasutati Philip A. Gale töögrupilt saadud 1,3-bisindolüüluureat (U016) ja Sandip A. Kadam'i poolt valmistatud karbasoolil põhinevaid retseptoreid CZ006 ja CZ009 (Joonis 2). Kõigi nende puhul on tegu laengult neutraalsete ühenditega, mille anioone siduv võime põhineb peamiselt vesiniksidemete moodustamisel. Nii nagu titrandi lahused, valmistati ka retseptorite lahused eraldi iga veesisaldusega solvendisegu jaoks ning retseptorite lahuseid kasutati maksimaalselt kuni 24 tundi pärast valmistamist.

Joonis 2. Käesolevas töös uuritud retseptorite struktuurid



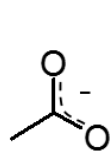
Retseptorite valik sõltus mitmest asjaolust: varasemalt uuritud ja saadud tulemustest, kättesaadavusest, struktuurist, lahustuvusest ja spektraalomadusest. Konkreetsemalt toimus esmane valik olemasolevate ja varem lubavaid tulemusi saadud retseptorite hulgast, mida oli ka uurimiseks piisav kogus olemas, jälgides ka seda, et valitud retseptoritel oleks teatav struktuurne mitmekesisus. Struktuuri seisukohast olid retseptorid erineva keerukusega, kuid kõik sisaldasid vähemalt nelja vesiniksideme-donoorset rühma. Samas erinesid retseptorite molaarmassid märgatavalt: 300 kuni 1000 g/mol.

Veel üks vägagi oluline aspekt valiku tegemise puhul oli lahustumine uuritavates solvendisegudes ning nagu CZ009 puhul ilmnes, siis oli lahustumine võimalik vaid DMSOd sisaldavates keskkondades. Veelgi keerukam oli olukord CZ006 lahustumisega: poole mõõtmisprotsessi pealt selgus, et DMSO/H₂O segudes veesisaldustel üle 0,325 moolmurru polnud lahustumine enam täielik.

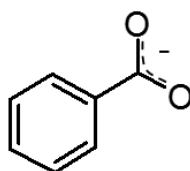
Kasutatud puhastest solventidest olid nii DMSO kui ka MeCN puhtusega $\geq 99,9\%$ ja tellitud firmast Sigma-Aldrich. Mõõtmised viidi läbi gravimeetriliselt valmistatud solvendisegudes, kus puhtale solvendile oli lisatud 0,5-20% massiprotsenti MilliQ Advantage A10 veepuhastist saadud vett. Titrandilahuste valmistamisel kasutati uuritavate anioonide

tetrabutüülamooniumsoolasid. Tetrabutüülamooniumatsetaat ja -bensoaat olid tellitud Sigma-Aldrichist ning tetrabutüülamooniumheksanoaadi valmistas Tartu Ülikooli doktorant Kristjan Haav. Kõikide anioonide soolasid hoiustati kuivkapis argooni atmosfääris.

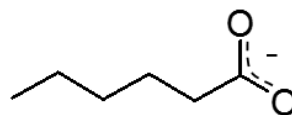
Joonis 3. Käesolevas töös uuritud anioonide struktuurid



Atsetaat



Bensoaat



Heksanoaat

2.3 Metoodika

Kõigepealt valmistati solvendilahus, mida tehti korraga olenevalt plaanitavate mõõtmiste arvust 12 ml kuni 30 ml. Seejärel valmistati retseptori lahus, milleks kaaluti viaali 2 mg retseptorit ja lisati kuni 2 ml kuni 3 ml solventi. Titrandilahuste valmistamisel kasutati kõrgema veesisalduse korral ühte kontsentreeritud lahust ning madalamate veesisalduste korral, tehti sellest ka 1 kuni 2 lahjendust. Titrandi alglahuse valmistamiseks kaaluti viaali 30 mg kuni 200 mg vastava karboksülaadi tetrabutüülamooniumsoola. Lahjade titrandilahuste valmistamisel lisati viaali keskmiselt 50 µl kuni 100 µl kontsentreeritud titrandi lahust ning sellele lisati 0,6 ml kuni 1,0 ml solventi.

Mõõtmise käigus täideti nii proovi- kui ka võrdlusküvett spektri registreerimiseks ligikaudu 1,75 ml solvendilahusega ning selle põhjal registreeriti spektromeetriga baasijoon. Siis lisati prooviküveti 20 µl kuni 100 µl uuritava retseptori lahust ning registreeriti uuesti spekter. Retseptori lahuse lisamise puhul oli oluline, et mõõtmisteks kasutatava neeldumispigi maksimaalne intensiivsus jääks optimaalsesse mõõdetavasse vahemikku, milleks keskeltläbi oli 0,65 – 0,75 neelduvuse ühikut. Seejärel lisati järk-järgult kogust suurendades titrandilahust ja pärast igat lisamist prooviküvett kaaluti ning registreeriti lahusest spekter. Võimalusel mindi vahepeal üle kontsentreeritud titrandilahuse kasutamise peale. Selline tiitrimine kestis, kuni saadava spektri kujus polnud enam muutusi märgata, mis tähendas, et praktiliselt kogu retseptor oli aniooniga seondunud. Ühe seondumiskonstandi määramise käigus registreeriti keskmiselt 10-15 spektrit. Saadud kaalumisanndmete ja registreeritud neelduvusspektrite abil arvutati täpne lisatud titrandi kogus ning valemi (4) abil kompleksi dissotsiatsioonimäärad.

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Tulemuste ülevaade

Valitud sünteetiliste retseptorite U016, CZ009 ja CZ006 seondumist karboksülaatanioonidega uuriti atsetonitriili ja dimetüülsulfoksiidis segudes veega. Vee moolimurd varieerus atsetonitriilis vahemikus 0,011 kuni 0,363 ja DMSO-s 0,021 kuni 0,520 (gravimeetriliselt mõlemal juhul 0,5-20% veesisaldus). (Siin ja edaspidi räägitakse veesisaldusest moolmurru kaudu, sest see annab parema ülevaate, kui palju tegelikult on lahuses veemolekule võrreldes DMSO ja MeCN molekulidega.) Esialgselt plaaniti ka kõrgemate veesisalduste juures mõõtmisi teostada, kuid retseptormolekulide madal lahustuvus ja nõrk seondumine tegi kõrgemate veesisalduste korral $\log K_{\text{ass}}$ täpse määramise võimatuks. Lisaks ilmnes, et retseptorid lahustuvad MeCN/H₂O segudes oluliselt halvemini kui DMSO/H₂O segudes ja seetõttu viidi MeCN/H₂O segudes mõõtmised läbi ainult ühe retseptoriga.

Veesisalduse suurenedes MeCN-s ja DMSO-s muutub ka vastavate solvendisegude tihedus. Selleks, et iga mõõdetud solvendisegu juures ka selle tihedust arvestada, määrati uuritud lahuste tihedused. Vastava korrektuuri arvestamine oli eelkõige oluline MeCN/H₂O segude põhjal, sest DMSO/H₂O segude puhul polnud tiheduse muutus uuritud segude piires piisavalt suur, et seondumiskonstandi arvutust mõjutada. DMSO tiheduseks võeti kõigi solvendisegude jaoks 1,1 g/cm³ ning seda õigustasid nii kirjanduse allikad kui ka kontrollmõõtmised [27]. Määratud MeCN/H₂O segude tihedused on toodud lisades tabelis L1. Saadud tiheduse väärtused erinesid MeCN solvendipurkidel antud tiheduse väärtustest, kuid samas langesid kokku teistes kirjanduse allikates toodud tiheduse väärtustega [28, 29].

Atsetonitriil-vesi segudes määrati ühtekokku 25 $\log K_{\text{ass}}$ väärtust ning dimetüülsulfoksiid-vesi segudes 69 $\log K_{\text{ass}}$ väärtust. Mõõtmistulemuste kokkuvõtet kajastab Tabel 1.

Tabel 1. Uuritud retseptorite seondumiskonstandid ($\log K_{\text{ass}}$) atsetaadi (AcO^-), bensoaadi (BzO^-) ja heksanoaadi (HxO^-) suhtes MeCN/ H_2O ja DMSO/ H_2O segudes.

MeCN									
$\text{X}_{\text{H}_2\text{O}}^a$	0,011	0,055	0,107	0,156	0,202	0,246	0,287	0,326	0,363
U016: AcO^-	6,10	4,57	3,47	2,74	2,24	1,82	1,54	1,26	1,09
U016: BzO^-	6,10	4,82	3,60	2,96	2,49	2,11	1,82	1,58	1,41
U016: HxO^-	<i>b</i>	<i>b</i>	3,77	3,08	2,60	2,15	1,85	1,59	1,34
DMSO									
$\text{X}_{\text{H}_2\text{O}}^a$	0,021	0,100	0,186	0,260	0,325	0,382	0,433	0,479	0,520
U016: AcO^-	4,70	4,06	3,53	3,13	2,79	2,40	2,10	1,91	1,68
U016: BzO^-	4,15	3,68	3,32	2,97	2,73	2,43	2,19	2,01	1,76
U016: HxO^-	4,88	4,27	3,83	3,40	3,02	2,70	2,45	2,22	1,93
CZ009: AcO^-	4,90	4,15	3,52	3,13	2,73	2,48	2,14	2,12	1,76
CZ009: BzO^-	4,07	3,63	3,31	2,90	2,65	2,36	2,17	2,09	1,88
CZ009: HxO^-	4,95	4,43	3,77	3,49	3,10	2,74	2,53	2,38	2,09
CZ006: AcO^-	5,14	4,44	3,78	3,32	2,96	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
CZ006: BzO^-	4,52	4,16	3,54	3,18	2,89	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
CZ006: HxO^-	5,25	4,52	4,08	3,74	3,45	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>

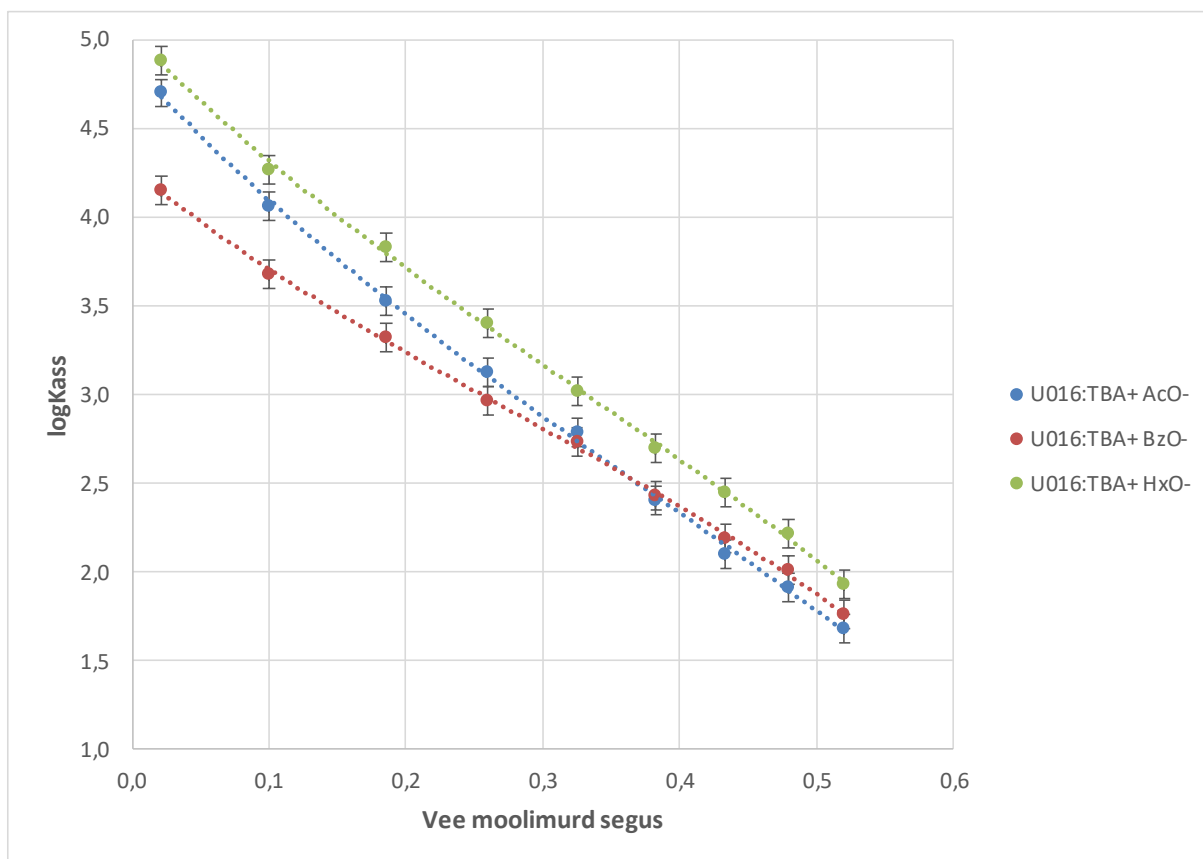
^a Vee moolimurd segus. ^b TBA heksanoaat oli vastavas lahustis madala lahustuvusega ja sadenes osaliselt. ^c Retseptori halva lahustuvuse tõttu ei olnud võimalik seondumist määrata.

Autori hinnangul on enamiku esitatavate $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste standardmääramatused orienteeruvalt 0,08. Mõnevõrra kõrgemad (ca 0,3) on need atsetonitriilis vee moolmurru 0,011 korral ning DMSO-s vee moolmurru 0,021 juures seondumisel retseptoriga CZ006 atsetaadi ja heksanoaadi jaoks. Standardmääramatust hinnati tehtud kordusmõõtmiste abil arvutatud keskmistatud kogutud standardhälbest. Lisaks kinnitas saadud tulemuste täpsust meie töögrupi poolt varem läbi viidud suhtelise TMR meetodiga absoluutkonstantide määramine ühe retseptori jaoks [30].

3.2 Anioonide seondumine retseptoriga U016

Retseptor U016 on uuritud retseptoritest kõige väiksema molekuliga ja hüdrofiilsem ning see retseptor annab neeldumismaksimumi 300 nm juures. Selle retseptori molekul saab anda karboksülaataniooniga 4 vesiniksidet – kaks urea NH rühmadega ja kaks indooli NH rühmadega [17]. U016 oli ainus retseptor, mille puhul mõõdeti seondumine nii DMSO/H₂O kui ka MeCN/H₂O keskkondades.

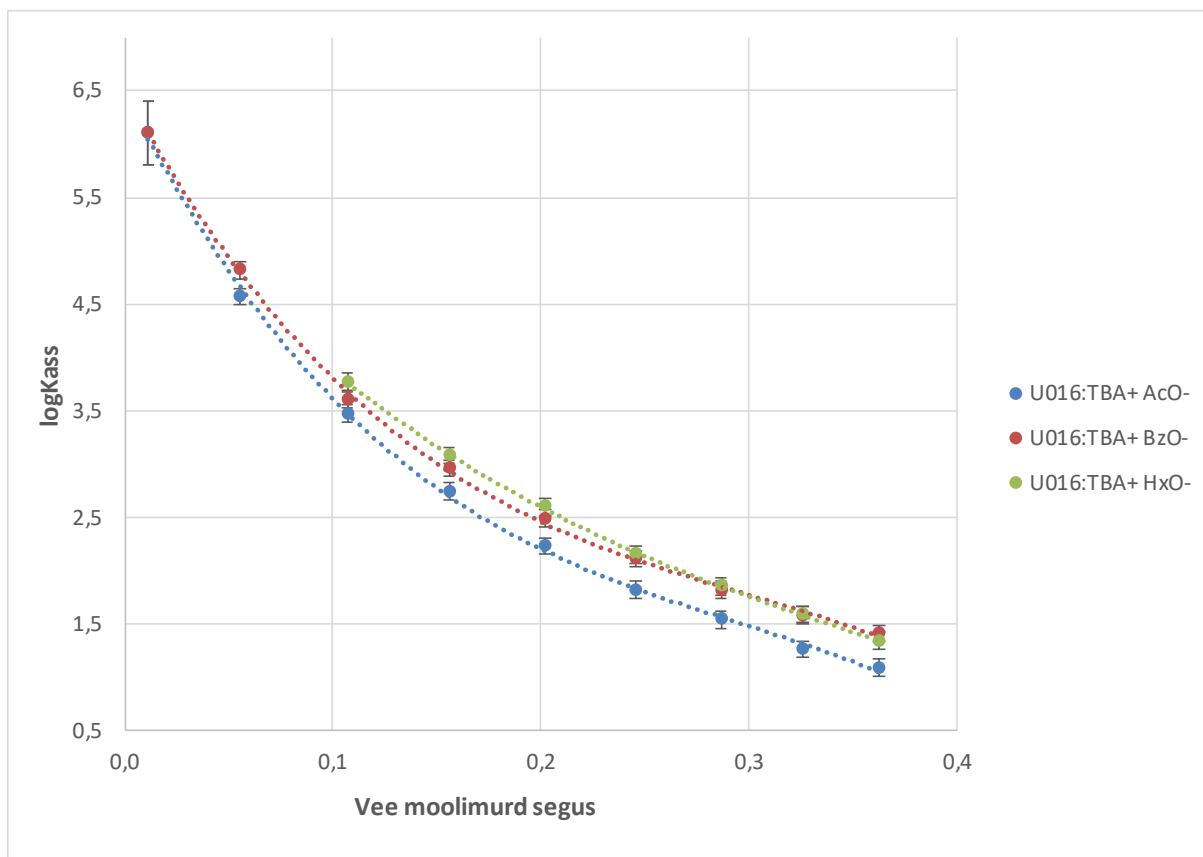
Joonis 4. Anioonide seondumine retseptoriga U016 DMSO-vesi segudes.



Vaadates anioonide seondumist retseptoriga U016 DMSO-vesi keskkondades ilmneb selgelt, et heksanoaat seondub kõigi veesisalduse juures kolmest anioonist kõige paremini. Heksanoaadiga suhteliselt sarnaselt, kuid ühtlaselt keskeltläbi 0,25 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut nõrgemini seondub atsetaat. Samas erineb neist omajagu bensoaadi seondumine, mis madala veesisalduse juures seondub teistest anioonidest märgatavalt nõrgemini, kuid samuti mõjutab seda ka madalamates kontsentratsioonides veesisalduse kasv vähem. Seda kuni umbes 0,4 moolmurru suuruse veesisalduseni, millest alates bensoaadi seondumise sõltuvus keskkonna koostisest muutub sarnaseks (paralleelseks) teiste anioonidega. Samas on bensoaadi veidi

erinevast käitumisest näha, et kõrgemate veesisalduste juures muutub retseptor bensoaadi suhtes atsetaadist tundlikumaks.

Joonis 5. Anioonide seondumine retseptoriga U016 MeCN-vesi segudes.



Retseptor U016 seondumisel MeCN-vesi segudes on samuti näha madalamatel veesisaldustel heksanoaadi tugevaimat seondumist, kuid ka siin ilmneb, et veesisalduse kasv mõjub kõige vähem bensoaadile. Seetõttu suudab bensoaat juba 0,35 vee moolmurru juures heksanoaadiga võrdselt või isegi veidi tugevamini seonduda. Samas on atsetaadi ja heksanoaadi omavaheline käitumine üldjoontes samasugune nagu DMSO-s: $\log K_{\text{ass}}$ erinevus jääb kõigi uuritud veesisalduste juures ligikaudu 0,3 $\log K_{\text{ass}}$ ühiku võrra heksanoaadi kasuks.

Väärrib märkimist, et madalate veesisalduste puhul ei olnud võimalik enam tetrabutüülheksanoaati MeCN/H₂O segudes lahustada. Sellest ilmneb, et vastava soola ioonid on solvendisegus veemolekulide poolt selektiivselt solvateeritud ning liiga madala veesisalduse korral ole see selektiivne solvatatsiooni lahustumiseks piisav. Seetõttu on ka Tabelis 1 puudu seondumiskonstantide väärtused 0,011 ja 0,055 vee moolmurru juures.

Samas, kuna antud töö eesmärk on peamiselt retseptorite seondumisvõime uurimine võimalikult kõrgete veesisalduste juures, siis see asjaolu kuigipalju töö tulemusi ei mõjuta.

Mõnevõrra probleemseks asjaoluks selle retseptori juures oli küllaltki madal lainepikkus, mille juures seondumise tulemusena spektri muutus aset leidis. Selle tõttu hakkas kõrgete bensoaadi titrandi kontsentratsioonide korral (mis olid vajalikud kõrgema veesisalduse korral) monitooritav maksimum osaliselt kattuma madalamal lainepikkusel asuva bensoaadi enda neeldumismaksimumi pikemalainelise osaga, mis alandas afiinsuskonstandi määramise täpsust. Selle parandamiseks mõõdeti bensoaadi spektrid eri veesisaldusega solvendisegudes ning seejärel oli võimalik vabale bensoaadile omane neeldumine spektrist maha lahutada. Tähelepanuväärne on veel, et kuigi bensoaadi segav mõju kasvas kontsentratsiooni ja seeläbi ka veesisalduse tõusuga, siis teisest küljest vähenes bensoaadi neeldumiskoeffitsient samuti märgatavalt veesisalduse tõusuga lahuses, aidates seeläbi vähendada bensoaadi neeldumise segavat mõju.

3.3 Seondumise võrdlus MeCN/H₂O ja DMSO/H₂O keskkondades

Võrreldes vee segusid MeCN ja DMSO puhul on üheks suurimaks erinevuseks kindlasti nende lahustite molekulide võime veemolekulidega seonduda – DMSO molekulidel on see oluliselt kõrgem kui MeCN molekulidel. Seda, kuivõrd "veelähedane" on saadav lahustite segu, saab hinnata keskkonna polaarsust iseloomustava ET(30) parameetriga [12]. See parameeter väljendab keskkonna polaarsust ja vesi on ET(30) skaalal kõigist tavalahustitest (kaugelt) kõige polaarsem ning vee ET(30) väärtus on võetud etalonina võrdseks 1,000-ga [18]. Seega iseloomustab ET(30) kaudselt ka seda kuivõrd käitub solvent või solvendisegu veesarnaselt. Temperatuuril 25 °C on ET(30) väärtus puhta MeCN jaoks 0,460 ja DMSO jaoks 0,444 [18]. Kui vee moolimurd DMSOs on 0,570 siis on ET(30) 0,654, kuid MeCN keskkonnas on juba 0,295 vee moolmurru juures ET(30) väärtus 0,717 [31]. Sellest saab järeldada, et kuigi vaadeldud DMSO/H₂O segus on oluliselt rohkem vett sees, siis DMSO ja vee molekulide vahelise tugeva interaktsiooni tõttu käitub segu oluliselt vähem vee moodi ning segus oleva vee mõju seondumisele on tugevasti vähendatud. Seetõttu on ka mingil määral põhjendatud, miks DMSO-vesi segudes oli palju suurema vee moolmurru korral veel seondumine palju paremini jälgitav.

Võrreldes anioonide seondumist retseptoriga U016 MeCN/H₂O ja DMSO/H₂O keskkondades, on võimalik välja tuua mitmeid olulisi erinevusi. Kui esmalt võrrelda seondumist peaaegu veevabades solventides, siis on näha, et seondumine on oluliselt tugevam MeCN keskkonnas, ületades seondumist DMSO keskkonnas enam kui 1 log K_{ass} ühikuga. Veesisalduse kasvades aga väheneb seondumistugevus MeCN-s palju kiiremini, olles juba 0,1 moolmurru juures kõigi anioonide jaoks nõrgem seondumisest DMSO-s ning 0,32 moolmurru juures on see atsetaadi ja heksanoaadi jaoks juba enam kui poole log K_{ass} ühiku võrra nõrgem.

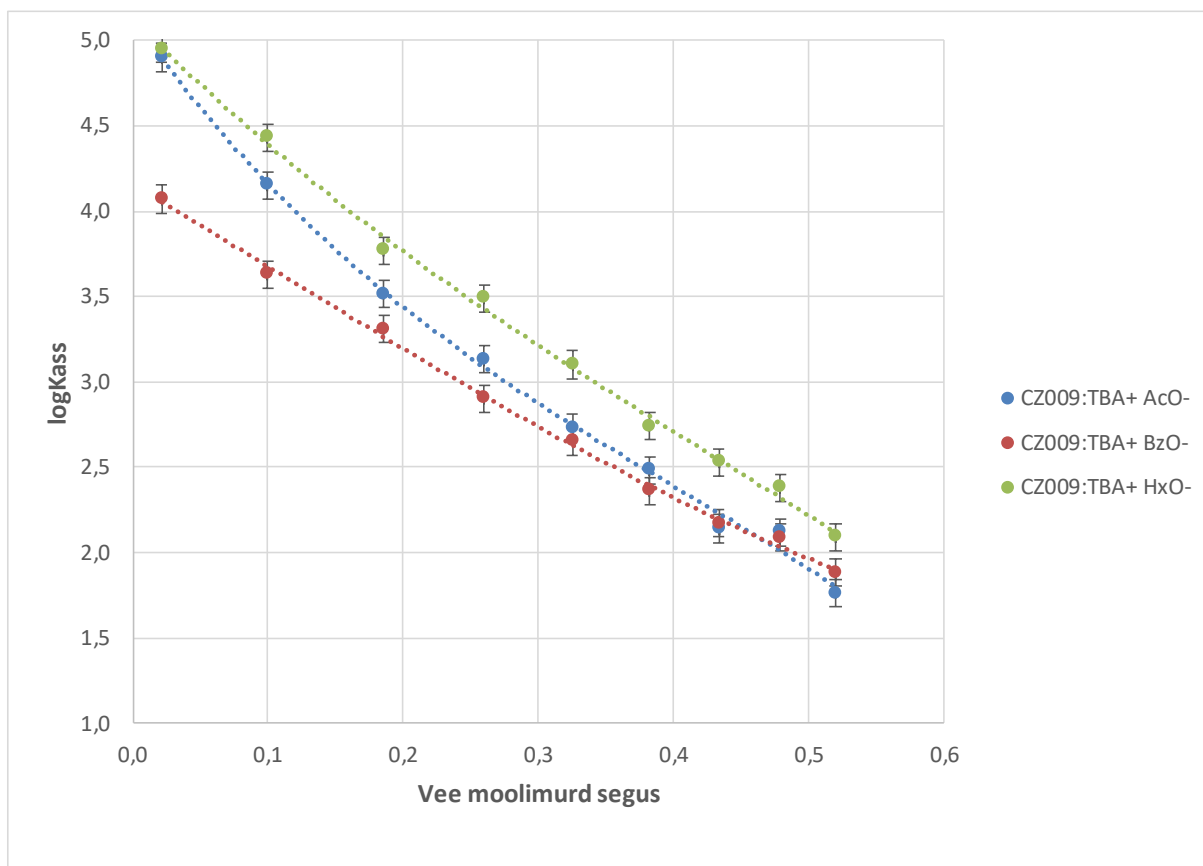
Selle peamiseks põhjuseks on arvatavasti solvendi ja vee molekulide vaheline toime. Arvestades, et DMSO molekulid oluliselt tugevamad vesiniksideme aktseptorid kui MeCN (ja vee) molekulid, siis vähendavad need seetõttu lisatud vee aktiivsust märksa efektiivsemalt kui MeCN molekulid. Sellisest käitumisest annab märku ka vastavate solvent-vesi lahuste valmistamine. DMSO/H₂O segude puhul on tänu arvukate vesiniksidemete moodustumisele segunemine eksotermiline ning sellest tulenevalt on valmistamisel võimalik tunda lahuse temperatuuri kasvu. MeCN/H₂O segude moodustumine on endotermiline ja toimub entroopiaefekti arvelt, mida näitab lahuse temperatuuri alanemine.

Veel on võimalik võrrelda erinevate anioonide seondumise erinevusi mõlemas keskkonnas. Siinkohal on ehk olulisemaks tähelepanekuks ümbritseva solvendi väiksem mõju bensoaadile kui teistele anioonidele. Kuigi seondumise tugevus veesisaldustes alates 0,1 moolmurrust on MeCN/H₂O segudes nõrgem kõigi anioonide jaoks, on siiski erinev nende omavaheline seondumistugevuse järjestus. Kui atsetaadi ja heksanoaadi omavaheline seondumise erinevus on ligikaudselt sama mõlema solvendi puhul, siis bensoaat edestab atsetaati MeCN-is kindlalt kõigi veesisalduste juures ning muutub kõrgemate veesisalduste juures isegi kõige tugevamini seondunud aniooniks.

3.4 Anioonide seondumine retseptoriga CZ009

Retseptor CZ009 molekul on veidi suurem ja hüdrofoobsem kui U016 ning annab neeldumismaksiumi ligikaudu 350 nm juures. See retseptor saab anda aniooniga 5 vesiniksidet – neli uurea NH rühmadega ja ühe karbasooli NH rühmaga [17]. Halva lahustumise tõttu atsetonitriilis, mõõdeti anioonide seondumisi selle retseptoriga vaid DMSO-vesi segudes.

Joonis 6. Anioonide seondumine retseptoriga CZ009 DMSO-vesi segudes.



CZ009 puhul on üldine seondumise trend üsna sarnane retseptorile U016 DMSO-vesi segudes. Samas on näha, et madalate veesisalduste puhul pole seondumise muutus seoses veesisalduse muutusega kõigi anioonide jaoks enam sama ühtlane. Nii mõjutab veesisalduse kasv moolimurru väärtuseni 0,2 atsetaadi seondumist tunduvalt tugevamalt kui teisi anioone.

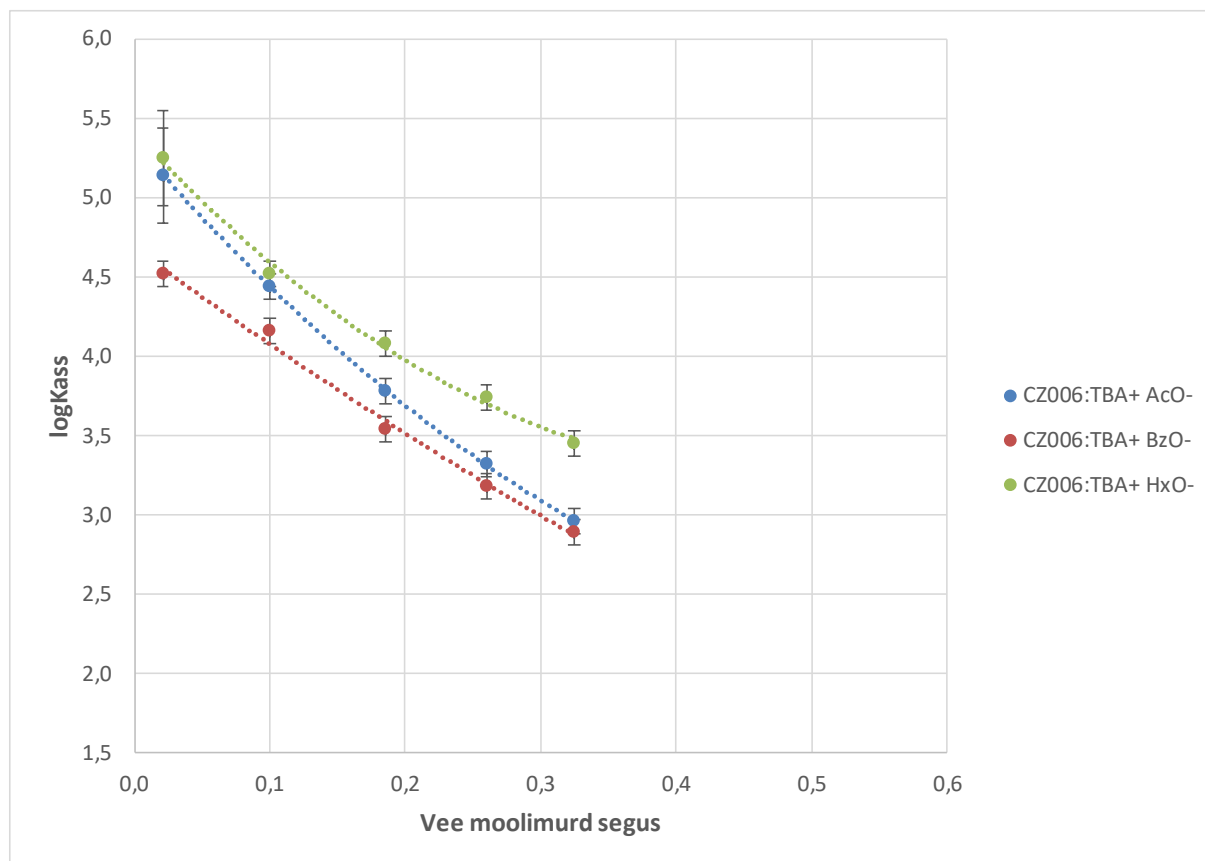
Võrreldes anioonide seondumist U016 ja CZ009-ga on näha ka mõningaid erinevusi. Näiteks ilmneb, et seondumine CZ009-ga on üldiselt veidi tugevam. Selle põhjuseks on tõenäoliselt ühe võrra suurem vesiniksidet andvate rühmade arv. Lisaks muutub atsetaat kõige nõrgemini seotud aniooniks U016 puhul märksa madalama veesisalduse korral kui CZ009 puhul.

3.5 Anioonide seondumine retseptoriga CZ006

Retseptor CZ006 on uuritud retseptormolekulidest kõige suurem ja hüdrofoobsem ning annab neeldumismaksiumi sarnaselt CZ009-le ligikaudu 350 nm juures. See retseptor saab anda

aniooniga kuni 6 vesiniksidet – kaks urea NH rühmadega, kaks karbasooli NH rühmadega ja kaks amiidi NH rühmadega [17].

Joonis 7. Anioonide seondumine retseptoriga CZ006 DMSO-vesi segudes.



Retseptor CZ006 puhul on kindlasti oluliseks erinevuseks lahustumine. Tänu pikkadele alküülahelatele on see retseptor teistest hüdrofoobsem, mistõttu selle retseptori lahustuvus halveneb keskkonna veesisalduse kasvades kiiremini kui teistel retseptoritel. Seetõttu muutub suurematel vee moolimurru väärtustel kui ligikaudu 0,325 lahus suspensiooniks ja seondumiskonstandi määramine pole enam võimalik. Samuti tähendab see, et seondumistrendide hindamine antud retseptoriga on veidi keerulisem väiksema mõõtevahemiku tõttu.

On aga näha, et seondumine CZ006-ga on samade lahuse koostiste juures märksa tugevam kui kahe eelneva retseptoriga, kuid sellest hoolimata jääb seondumise üldine trend samaks ja võrreldes CZ009-ga peaaegu identseks. Seda just eelkõige atsetaadi käitumise osas, mille seondumine nõrgeneb taaskord palju kiiremini teiste anioonide seondumisest madalate veesisalduste korral. Samas on märgata ka veidi teistsugust käitumist heksanoaadi jaoks,

mille seondumine ei vähene veesisalduse kasvades nii järsult kui teiste retseptorite puhul. Siin võib ehk üheks põhjuseks olla teatud tüüpi hüdrofoobne vastastikmõju, sest nii retseptoril kui ka anioonil on olemas pikk alküülalabel, mis polaarsete veemolekulide arvu kasvades võivad üksteisega solvofoobse efekti kaudu interakteeruda.

3.6 Järeldused

Võrreldes seondumise tugevust sõltuvalt retseptormolekulist, on üpriski selgelt näha, et mida rohkem vesiniksidemeid retseptor anda suudab, seda paremini retseptor ka aniooni seob. Samas oleks oluline edasistel uuringutel keskenduda selliste retseptorite arendamisele, mis lahustuksid ka suurema veesisalduse korral, kuna suuremate retseptormolekulide puhul võib lahustuvus osutada suuremaks probleemiks kui seondumise nõrgenemine.

Üldiselt on näha, et veesisalduse tõus alandab kõigi uuritud retseptorite sidumisvõimet kõigi uuritud anioonide suhtes. Seda illustreerib väga hästi ka seondumisisotermi kuju muutus, mis on toodud lisades joonisel L1. Kõige tugevam efekt ilmneb atsetaadiga, mis kõigi retseptorite puhul puhtas solvendis, konkureeris seondumistugevuse poolest heksanoaadiga. Juba vee moolimurru 0,2 juures oli atsetaadi seondumine pigem lähedane bensoaadi seondumisele. See on ilmselt tingitud tõsiasjast, et atsetaat on uuritud anioonidest kõige väiksem ja hüdrofiilsem, olles seega veesisalduse kasvades võrreldes ülejäänud kahe iooniga üha tugevamini ümbritsetud solvaatkatttega.

Samuti ilmnes, et veesisalduse kasv mõjutas kõige vähem bensoaadi seondumist. Väga hästi väljendus see võrdluses atsetaadiga, mis oli DMSO-vesi segudes esialgu kõigi retseptorite jaoks bensoaadist paremini seotud, kuid nii U016 kui ka CZ009 puhul oli näha veesisalduse kasvades lõpuks bensoaadi tugevamat seondumist. Selle põhjuseks võib pidada bensoaadi molekulidel oleva hüdrofoobse aromaatses tuuma mõju, mis on nõrgalt solvateeritud, mistõttu ka veesisalduse kasvades toetab seondumist üha enam solvofoobne vastastikmõju.

Lisaks nendele eripärasustele oli märgata ka teatud määral hüdrofoobset vastastikmõju heksanoaadi ja retseptor CZ006 pikkade alküülalabelate vahel veesisalduse kasvul. Seda just eriti arvestades, et nii seondumisel nii U016 kui ka CZ009-ga DMSO-vesi keskkondades oli heksanoaadi seondumise nõrgenemine võrdlemisi lineaarne, kuid CZ006 puhul on märgata arvestav kõrvalekalle lineaarsusest, mida küll kahjuks polnud lahustuvusprobleemide tõttu võimalik kõrgemate veesisalduste korral edasi jälgida.

Võrreldes DMSO ja MeCN veesegude käitumist, võib väita, et kuigi puhtas või väga vähese veesisaldusega MeCN keskkonnas seondumise uurimine annab võrdlemisi tugeva seondumisaafiinsusega tulemusi, ei ole MeCN kuigi heaks keskkonnaks suuremate veesisalduste juures. DMSO puhul oleks seevastu võimalik tugevamini anioone siduvate retseptorite puhul liikuda ka 0,7-0,8 moolmurru veesisalduseni. Seda eelkõige DMSO ja vee molekulide omavaheliste tugevate vastastikmõjude tõttu, mis vähendavad vee molekulide aktiivsust aniooni ja retseptori solvatatsioonil.

Kokkuvõte

Töös uuriti 3 karboksülaataniooni: atsetaadi, bensoaadi ja heksanoaadi seondumist 3 sünteetilise anioonitundliku retseptoriga erineva veesisaldusega dimetüülsulfoksiidi ja atsetonitriili keskkondades. Veesisaldus ulatus neis lahustes MeCN puhul moolimurru väärtuseni 0,36 ja DMSO puhul moolimurru väärtuseni 0,52. Kokku määrati UV-Vis spektrofotomeetrilise tiitrimise abil 94 absoluutse seondumiskonstandi ($\log K_{\text{ass}}$) väärtused. Saadud tulemuste põhjal koostati seondumiskonstandi ja veesisalduse vahelisi seoseid kirjeldavad graafikud, mille põhjal oli võimalik saada aimu esinevatest trendidest ning ka esinenud sekundaarsetest efektidest.

Veesisalduse tõus orgaanilises lahustis alandas kõigi uuritud anioonide seondumist kõigi retseptorite külge. Samas oli näha, et seondumise vähenemine mõjutas teatud olukordades erinevaid anioone erinevalt. Nii ilmnas, et veesisalduse kasv mõjutas kõige rohkem väikeste mõõtmatega atsetaatiooni ning väikseim oli selle mõju aromaatses tuumaga bensoaadile. Samuti oli teatud määral näha hüdfoobset efekti, mille käigus heksanoaadi seondumist parandas retseptori CZ006 pikkade alküülahelate olemasolu. Taaskord leidis kinnitust tõsiasia, et mida rohkem vesiniksidemeid retseptor anda suudab, seda paremini retseptor ka aniooni seob. Parema seondumise tagamiseks kõrge veesisaldusega keskkonnas on vajalik lisaks piisavale hulgale vesiniksidemetele ka mõne muu seondumisse panustava efekti kaasamine.

Ilmnes, et kuigi MeCN keskkonnas seondumise uurimine annab võrdlemisi tugeva seondumisaafiinsusega tulemusi, ei ole MeCN kuigi heaks keskkonnaks suuremate veesisalduste juures. DMSO puhul oleks seevastu võimalik tugevamini anioone siduvate retseptorite puhul liikuda ka 0,7-0,8 moolimurru veesisalduseni. Samuti tekitas retseptorite lahustuvus mitmeid probleeme nii veesisalduse kasvades kui ka eeskätt atsetonitriili keskkondades. Seega võib järeldada, et edasiste uuringute jätkamine oleks peamiselt eelistatud just DMSO/H₂O segudes.

Töö on oluliseks osaks fundamentaalanalüüsina kõrge veesisaldusega keskkondade jaoks anioonitundlike retseptorite ja nende põhjal töötavate sensorite välja arendamisel. Kasutades ära töös leitud seaduspärasusi oleks võimalik välja arendada ka palju kõrgema veesisaldusega keskkondade jaoks sünteetilisi anioonitundlikke retseptoreid.

Summary

Influence of water on the binding ability of anion-sensitive molecular receptors

Indrek Saar

In the current thesis, the binding constants of three carboxylate anions: acetate, benzoate and hexanoate with three synthetic receptors were measured in a dimethyl sulfoxide-water and acetonitrile-water media. These solutions contained up to 0.36 mole fraction water in MeCN and 0.52 mole fraction water in DMSO. Using UV-Vis spectrophotometric titration in total 94 absolute binding constant values were obtained. Based on these results some conclusions were made to describe the effects that took place.

With the increase of water content in solution, binding strength for all the anions with all the receptors decreased. However, there were some effects that showed, that the decrease in binding strength was different for different anions. For example, the increase in water content had the strongest influence on the small-sized acetate ion and had the smallest effect on benzoate. Furthermore, a solvophobic effect was identified, when the binding of hexanoate did not decrease similarly to previous experiments, because of long alkyl chains in receptor molecule. Finally, it was yet again seen, that with more possible hydrogen-bond donor centers the binding of anions was stronger. In conclusion, it can be said that to study anion binding in water rich media, it is necessary for neutral molecular receptors to have sufficient amount of hydrogen bond donor sites as well as some other interactions, that could contribute to stronger binding.

On the aspect of suitable media for future research, DMSO was found to be the preferred solvent in comparison to MeCN. Although in pure MeCN the binding is stronger, with the increase of water content however it decreases much faster than in DMSO. In addition, some solubility problems of receptors arose with the increase of water content especially in acetonitrile.

This work has an important role in fundamental analysis for developing anion recognition sensors in media with high water content. The data found during this research gives insight about the possible structures for designing more appropriate receptors for sensors.

Kasutatud kirjandus

1. Manna, A. K. Supramolecular Chemistry-Concepts and Applications. *Int. J. Sci. Res.* **2015**, 4 (4), 892–899.
2. Lehn, J.-M. Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27 (1), 89–112.
3. De Greef, T. F. A.; Smulders, M. M. J.; Wolffs, M.; Schenning, A. P. H. J.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. Supramolecular Polymerization. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (11), 5687–5754.
4. Tianyang, Y.; Yao, W.; Pengfei, X. A New Approach for Supramolecular Iminium Catalysis. *Acta Chim. Sin.* **2014**, 72 (7), 845–848.
5. Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery. *ACS Nano* **2007**, 1 (1), 50–56.
6. Anslyn, E. V. Supramolecular Analytical Chemistry. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (3), 687–699.
7. Sahoo, S. K.; Sharma, D.; Bothra, S.; Roy, S. M.; Kumar, R.; Kumar, A. S. K.; Nandre, J. P.; Patil, U. D.; Callan, J. F. Pyridoxal Derived Chemosensor: Its Application in Anion Sensing and Molecular Logic Gate Building. *Indian J. Chem. Sect. -Inorg. Bio-Inorg. Phys. Theor. Anal. Chem.* **2016**, 55 (1), 44–50.
8. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Schalley, C., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
9. Rotello, V. M. Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (46), 14524–14524.
10. Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. Modern Physical Organic Chemistry. In *Modern Physical Organic Chemistry*; 2006.
11. Busschaert, N.; Caltagirone, C.; Van Rossom, W.; Gale, P. A. Applications of Supramolecular Anion Recognition. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (15), 8038–8155.
12. Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; 3rd edition; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
13. Saenger, W. Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19 (5), 344–362.

14. Beer, P. D.; Gale, P. A. Anion Recognition and Sensing: The State of the Art and Future Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (3), 486–516.
15. Evans, N. H.; Beer, P. D. Advances in Anion Supramolecular Chemistry: From Recognition to Chemical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (44), 11716–11754.
16. Bordwell, F. G. Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21* (12), 456–463.
17. Martin, K.; Nöges, J.; Haav, K.; Kadam, S. A.; Pung, A.; Leito, I. Exploring Selectivity of 22 Acyclic Urea-, Carbazole- and Indolocarbazole-Based Receptors towards 11 Monocarboxylates. *Org. Biomol. Chem.*(Avaldamiseks esitatud 27.05.17)
18. Reichardt, C. Tabel A-1. In *Solvents and Solvent effects in Organic Chemistry*; 3rd edition; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004; pp 472–475.
19. Kubik, S. Anion Recognition in Water. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (10), 3648–3663.
20. Yang, R.; Liu, W.-X.; Shen, H.; Huang, H.-H.; Jiang, Y.-B. Anion Binding in Aqueous Solutions by N-(Isonicotinamido)-N'-phenylthiourea-Based Simple Synthetic Neutral Receptors. Role of the Hydrophobic Microenvironment of the Receptor Molecule. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (16), 5105–5110.
21. Marcus, Y.; Kamlet, M. J.; Taft, R. W. Linear Solvation Energy Relationships: Standard Molar Gibbs Free Energies and Enthalpies of Transfer of Ions from Water into Nonaqueous Solvents. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92* (12), 3613–3622.
22. Fan, E.; Van Arman, S. A.; Kincaid, S.; Hamilton, A. D. Molecular Recognition: Hydrogen-Bonding Receptors That Function in Highly Competitive Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (1), 369–370.
23. Sessler, J. L.; Gross, D. E.; Cho, W.-S.; Lynch, V. M.; Schmidtchen, F. P.; Bates, G. W.; Light, M. E.; Gale, P. A. Calix[4]pyrrole as a Chloride Anion Receptor: Solvent and Counteraction Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (37), 12281–12288.
24. Kütt, A.; Leito, I.; Kaljurand, I.; Sooväli, L.; Vlasov, V. M.; Yagupolskii, L. M.; Koppel, I. A. A Comprehensive Self-Consistent Spectrophotometric Acidity Scale of Neutral Brønsted Acids in Acetonitrile. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (7), 2829–2838.
25. Haav, K.; Kadam, S. A.; Toom, L.; Gale, P. A.; Busschaert, N.; Wenzel, M.; Hiscock, J. R.; Kirby, I. L.; Haljasorg, T.; Lõkov, M.; et al. Accurate Method To Quantify Binding in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (16), 7796–7808.
26. Sooväli, L.; Kaljurand, I.; Kütt, A.; Leito, I. Uncertainty Estimation in Measurement of pK_a Values in Nonaqueous Media: A Case Study on Basicity Scale in Acetonitrile Medium. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *566* (2), 290–303.

27. LeBel, R. G.; Goring, D. A. I. Density, Viscosity, Refractive Index, and Hygroscopicity of Mixtures of Water and Dimethyl Sulfoxide. *J. Chem. Eng. Data* **1962**, 7 (1), 100–101.
28. M. del C. Grande; Bianchi, H. L.; Marschoff, C. M. On the Density of Pure Acetonitrile. *J. Argent. Chem. Soc.* **2004**, 92 (4–6), 109–114.
29. Moumouzlas, G.; Panopoulos, D.; Ritzoulis, G. Excess Properties of the Binary-Liquid System Propylene Carbonate + Acetonitrile. *J. Chem. Eng. Data* **1991**, 36 (1), 20–23.
30. Kadam, S. A.; Martin, K.; Haav, K.; Toom, L.; Mayeux, C.; Pung, A.; Gale, P. A.; Hiscock, J. R.; Brooks, S. J.; Kirby, I. L.; et al. Towards the Discrimination of Carboxylates by Hydrogen-Bond Donor Anion Receptors. *Chem. – Eur. J.* **2015**, 21 (13), 5145–5160.
31. Bosch, E.; Roses, M.; Herodes, K.; Koppel, I.; Leito, I.; Koppel, I.; Taal, V. Solute-Solvent and Solvent-Solvent Interactions in Binary Solvent Mixtures .2. Effect of Temperature on the E(T)(30) Polarity Parameter of Dipolar Hydrogen Bond Acceptor-Hydrogen Bond Donor Mixtures. *J. Phys. Org. Chem.* **1996**, 9 (6), 403–410.
32. Manov, G. G.; Bates, R. G.; Hamer, W. J.; Acree, S. F. Values of the Constants in the Debye—Hückel Equation for Activity Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, 65 (9), 1765–1767.

Lisad

Lisa 1. Arvutusmeetodid $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste leidmiseks.

Arvutuste läbiviimiseks on esmalt vajalik leida retseptor-anioon kompleksi dissotsiatsioonimäär, mida saab teha valemiga:

$$\alpha = \frac{[\text{RH}]}{[\text{RH}] + [\text{RHA}^-]} = \frac{A^\lambda - A_{\text{RHA}^-}^\lambda}{A_{\text{RH}}^\lambda - A_{\text{RHA}^-}^\lambda} \quad (4)$$

, kus A^λ on neelduvus kindlas tiitrimispunktis ning A_{RH}^λ ja $A_{\text{RHA}^-}^\lambda$ on vastavalt vaba ja seotud retseptori neelduvused.

Arvutus iga individuaalse tiitrimispunkti järgi

Üheks võimalikuks variandiks $\log K_{\text{ass}}$ väärtuse leidmisel on arvutada seondumiskonstandi väärtus iga tiitrimispunkti jaoks ning seejärel leida saadud väärtuste keskmine. Selleks on vaja viia valem (2) kujule:

$$\log K_{\text{ass}} = \log \frac{(1-\alpha) \gamma_{\text{RHA}^-}}{\alpha \cdot [\text{A}^-] \gamma_{\text{A}^-}} \quad (5)$$

, kus $[\text{A}^-]$ vaba aniooni kontsentratsioon lahuses ning γ_{RHA^-} moodustunud kompleksi ja γ_{A^-} vaba aniooni aktiivsuskoeffitsiendid. Viimaste leidmiseks kasutati Debye-Hückeli võrrandit, mis dimetüülsulfoksiidi jaoks näeb välja selline [32]:

$$\log \gamma = - \frac{1,12 z^2 \sqrt{I}}{1 + 0,43 a \sqrt{I}} \quad (6)$$

, kus z on iooni laeng, I on ioonne jõud ja a on iooni efektiivne raadius lahuses. Atsetonitrili korral on Debye-Hückeli konstandid vastavalt 1,64 ja 0,48 [32].

Samas on oluline arvestada, et saadud aktiivsuskoeffitsientide näol on tegu teatud lähendusega tegelikele väärtustele. Nimelt pole uuritavad ioonid ideaalselt sfäärilised ning veelgi enam mängib rolli asjaolu, et mõõtmisi ei viidud läbi puhta DMSO või MeCN keskkonnas, millele vastavaid konstante kasutati arvutustes. Küll aga võib esimeses lähenduses lugeda saadud tulemused täiesti sobivateks, sest valemis (5) esineb aktiivsuskoeffitsientide jagatis, mis seetõttu enam vähem taanduvad välja. Lisaks oli näha, et väikestes piirides aktiivsuskoeffitsientide varieerimisel polnud mingit mõju arvutatud seondumiskonstandile.

Eksperimendiandmete lähendamine mittelineaarne seondumisisotermiga

Alternatiivne meetod seondumiskonstandi leidmiseks on saavutatav eksperimentaalsete andmete lähendamisel seondumise isotermiga kasutades vähimruutude meetodit. Selleks kombineeritakse valemid (2) ja (4) ning saadakse järgnev võrrand:

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \frac{K_{\text{ass}} \frac{[A^-] \gamma_{A^-}}{\gamma_{\text{RHA}^-}}}{1 + K_{\text{ass}} \frac{[A^-] \gamma_{A^-}}{\gamma_{\text{RHA}^-}}} \quad (7)$$

Siin on ΔA võrdne $A^\lambda - A_{\text{RH}}^\lambda$ ning vähimruutude meetodi abil leiti K_{ass} ja ΔA_{\max} ($= A_{\text{RH}}^\lambda - A_{\text{RHA}^-}^\lambda$) selliselt, et arvutatud ja eksperimentaalsete ΔA väärtuste erinevuste ruutude summa oleks minimaalne.

Lisa 2. Mõõdetud solvendisegude tihedused

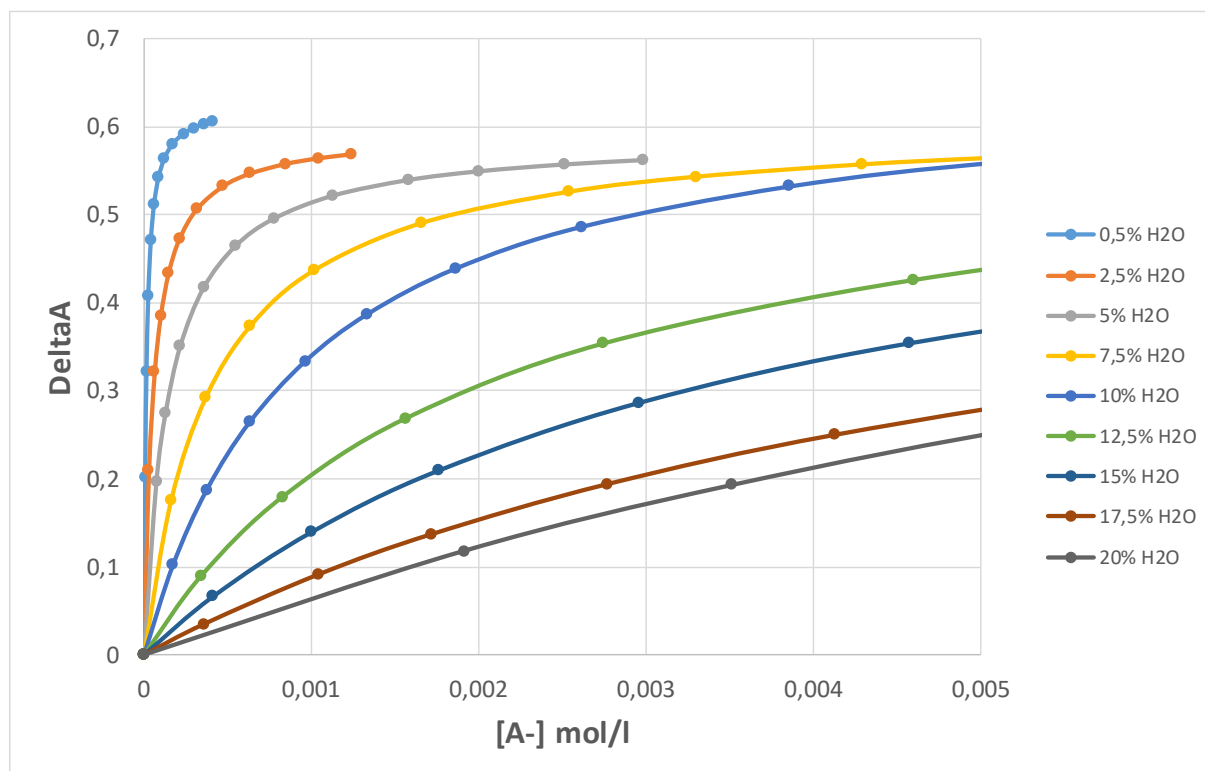
Tabel L1. MeCN/H₂O segude määratud tihedused.

X _{H₂O} ^a	ρ (g/cm ³)
0,0000	0,7770
0,0113	0,7781
0,0552	0,7824
0,1559	0,7930
0,2455	0,8042
0,3258	0,8159
0,4316	0,8328

^a Vee moolimurd segus.

Lisa 3. Seondumisisotermi muutus keskkonna veesisalduse tõustes

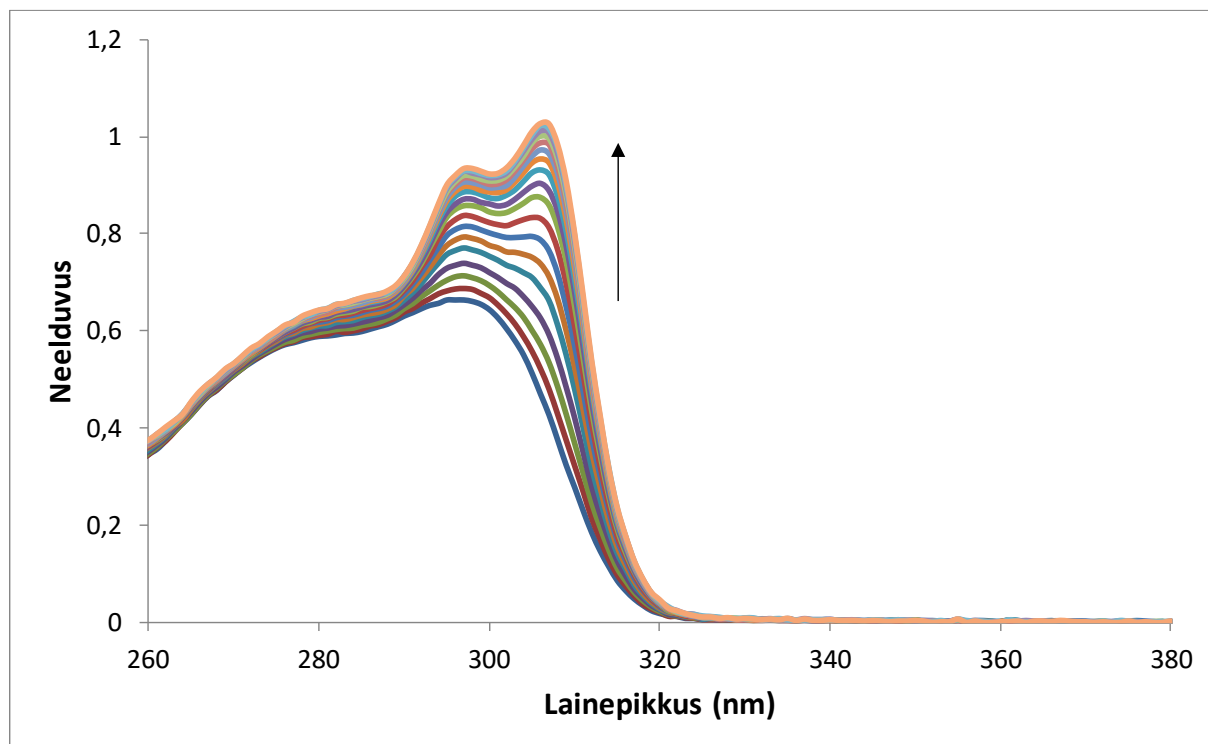
Joonis L1. 1,3-bisindolüülurea (U016) + heksanoaat DMSO-vesi segus



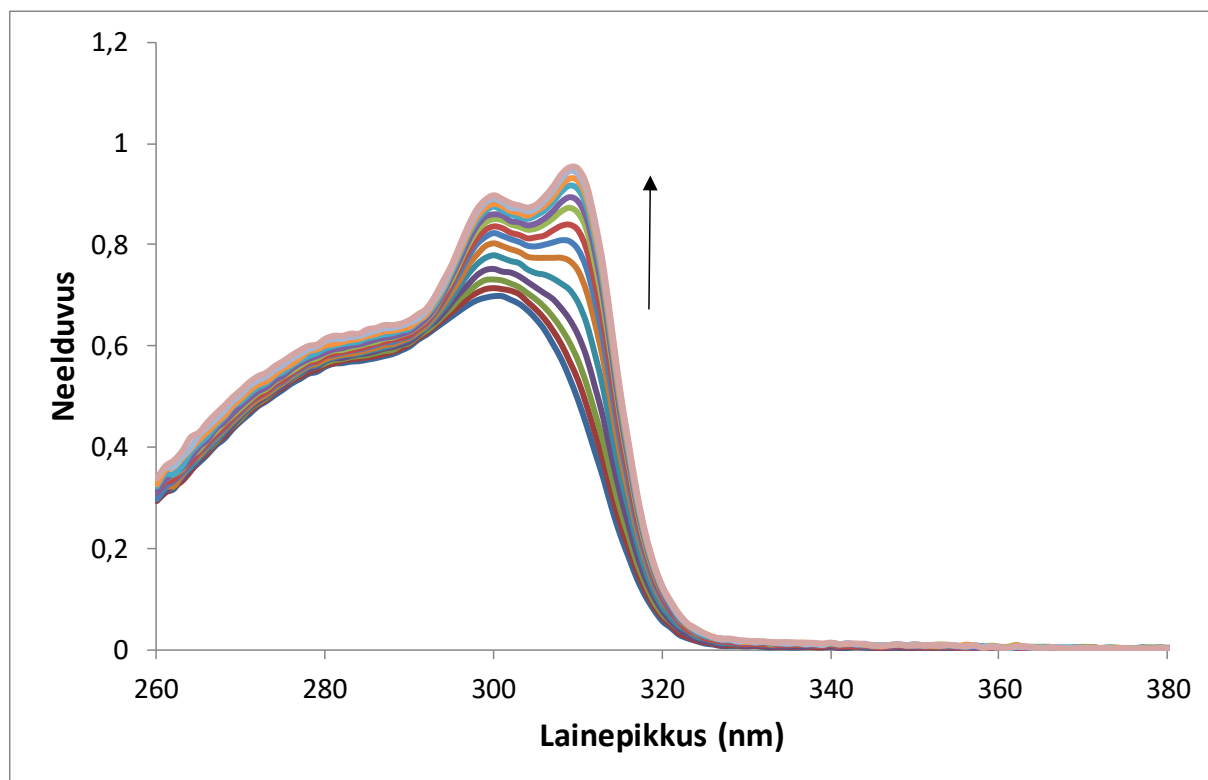
Antud joonise kohta tuleb märkida, et kõigi isotermide jaoks oli vähemalt kümme tiitrimispunkti ning seega nagu näha kõrgeimate veesisalduste juures, siis jooksevad graafikud veel pikalt edasi.

Lisa 4. UV-Vis spektrofotomeetrilise tiitrimise spektrid

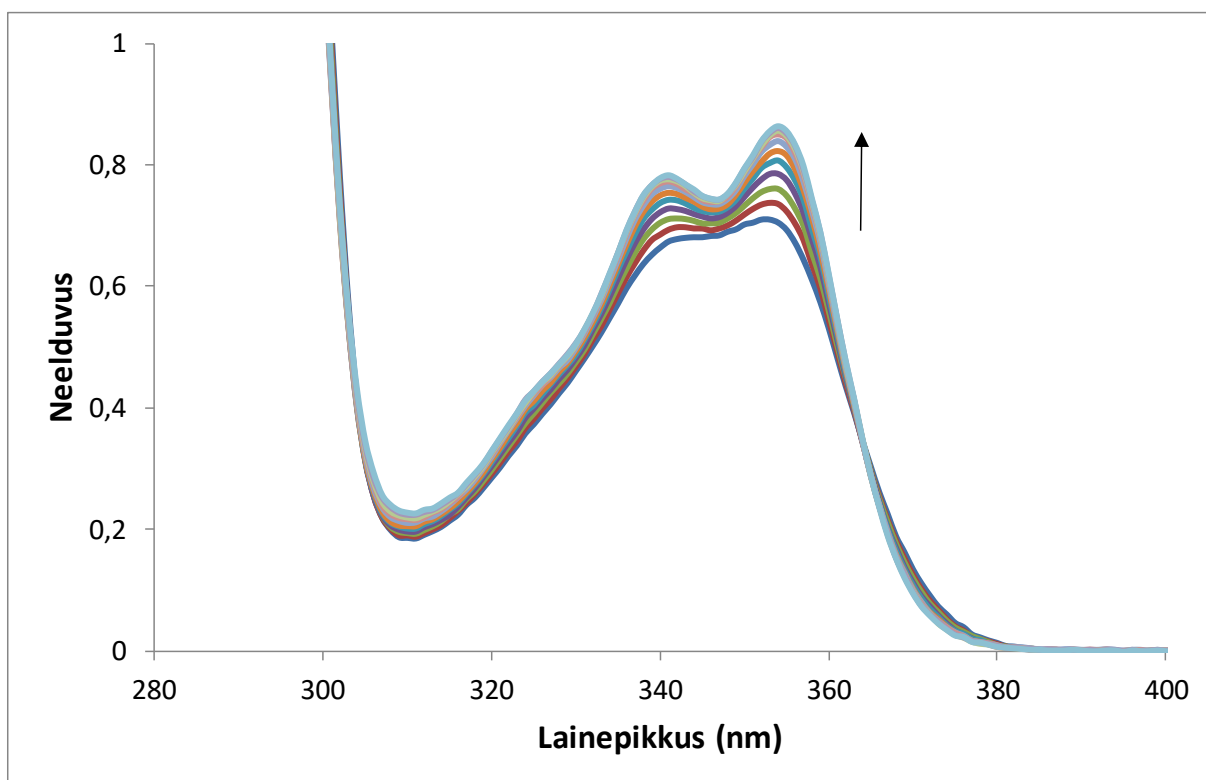
Joonis L2. 1,3-bisindolüüluurea (U016) + atsetaat MeCN lahuses vee moolimurruga 0,107.



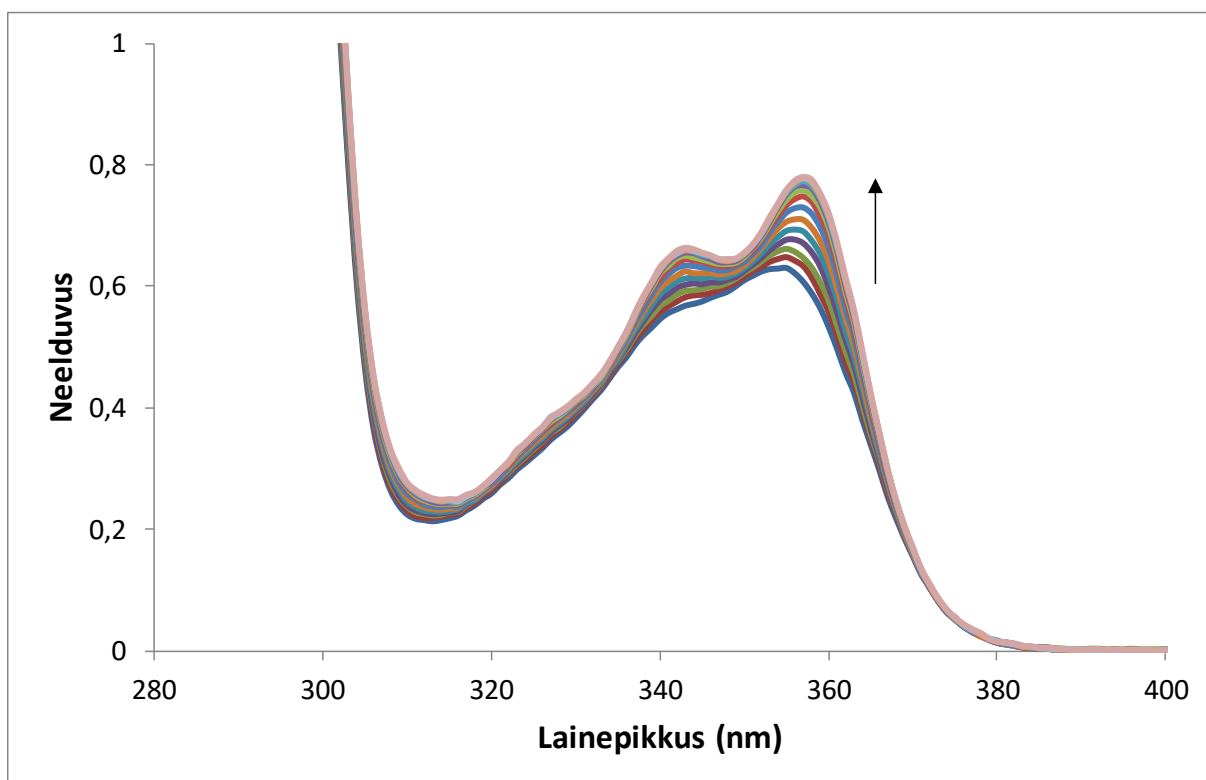
Joonis L3. 1,3-bisindolüüluurea (U016) + atsetaat DMSO lahuses vee moolimurruga 0,186.



Joonis L4. CZ009 + bensoaat DMSO lahuses vee moolimurruga 0,100



Joonis L5. CZ006 + heksanoaat DMSO lahuses vee moolimurruga 0,186.



Infoleht

Keskkonna veesisalduse mõju anioonitundlike retseptorite seondumisvõimele

Käesoleva töö eesmärgiks oli kolme karboksülaataniooni (atsetaadi, bensoaadi ja heksanoaadi) seondumisvõime hindamine kolme erineva sünteetilise molekulaarretseptoriga suhteliselt suure veesisaldusega keskkondades. Selleks määrati erineva veesisaldusega lahustes anioon-retseptor komplekside seondumiskonstandid kasutades UV-Vis spektrofotomeetrilist tiitrimist.

Töö tulemusena selgus, et kuigi veesisalduse kasv nõrgendab anioonide seondumist väga oluliselt, siis mõningatel juhtudel ilmnes erinevate anioonide ja retseptorite puhul teatud iseärasusi, mis kaldusid kõrvale üleüldisest seondumise nõrgenemise trendist. Lisaks oli võimalik hinnata ka edasiste uuringute sihis solvendi sobivust, milleks osutus atsetonitriili ja dimetüülsulfoksiidi võrdluses pigem viimane.

Märksõnade loend: supramolekulaarkeemia, veesisaldus, karboksülaatanioonid, UV-Vis spektroskoopia, afiinsuskonstandid.

CERCS: P300 analüütiline keemia

Influence of water on the binding ability of anion-sensitive molecular receptors

The purpose of this thesis was to evaluate the influence of relatively large water content in media on the binding of three synthetic receptor molecules with three different carboxylates (acetate, benzoate and hexanoate). For this, UV-Vis spectroscopic titration method was applied to measure the affinity constants in solvent media with different water content.

As a result, it was revealed that although the increase in water content significantly decreases the binding strength of receptor molecules, some disparities from such behavior were also observed. In addition, it was possible to determine the suitability of solvent for future research and it occurred that between acetonitrile and dimethyl sulfoxide the latter should be preferred.

Keywords: supramolecular chemistry, water content, carboxylate anions, UV-Vis spectroscopy, association constants.

CERCS: P300 analytical chemistry

Litsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Indrek Saar,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Keskkonna veesisalduse mõju anioonitundlike retseptorite seondumisvõimele“, mille juhendajad on Ivo Leito ja Kristjan Haav,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **31.05.2017**